

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

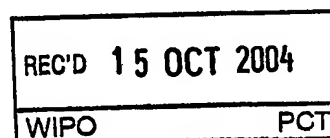
23. 8. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 8月13日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-293062  
[ST. 10/C]: [JP 2003-293062]



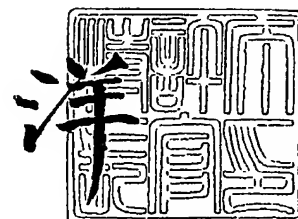
出 願 人  
Applicant(s): 日本たばこ産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月30日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 031254  
【提出日】 平成15年 8月13日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 植物イノベーションセンタ  
                                ー内  
    【氏名】 石田 祐二  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004569  
    【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100089705  
    【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区  
                                ユアサハラ法律特許事務所  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 社本 一夫  
    【電話番号】 03-3270-6641  
    【ファクシミリ番号】 03-3246-0233  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100076691  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 増井 忠弐  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100075270  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 泰  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100080137  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 千葉 昭男  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100096013  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 富田 博行  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100092886  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 村上 清  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 051806  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0302083

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

- 1) 植物材料を調製し、次いで
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる、  
ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であ  
って、上記 1) および／または 2) の工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高め  
た培地を用いることを特徴とする、前記方法。

**【請求項 2】**

金属塩が、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) またはグルコン酸銅 ( $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Cu}$ ) である、  
請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

金属塩が、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) において金属塩の濃  
度を高めた培地を用いる、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) において、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) の濃度を高めた培地を用いる、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方  
法。

**【請求項 6】**

少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) において、 $1 \sim 10$   
 $\mu\text{M}$  の硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) を含む培地を用いる、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記  
載の方法。

**【請求項 7】**

植物材料を調製する工程 1)、および／または、植物材料をアグロバクテリウムに感染  
させる工程 2) において、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からなる群か  
ら選択される、少なくとも 1 の処理を植物材料に行うことをさらに含む、請求項 1 ないし  
6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

植物が、単子葉植物である、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

植物が、トウモロコシである、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

植物が、双子葉植物である、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

植物材料が未熟胚である、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 12】**

- 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) に次いで、さらに、
- 3) 形質転換細胞を選抜し、
  - 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、
- 工程を含む、請求項 1 ないし 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

- 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) に次いで、さらに、  
少なくとも以下の 1 の段階において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いて、
- 3) 形質転換細胞を選抜し、
  - 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、
- 工程を含む、請求項 1 ないし 11 に記載の方法。

**【請求項 14】**

請求項 12 または 13 に記載の方法を使用することを特徴とする、形質転換植物の製造  
方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】銅イオンの添加により植物の形質転換効率を向上させる方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を効率よく行う方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アグロバクテリウム法による遺伝子導入は、アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換方法である。土壌細菌アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) は、植物に感染すると、アグロバクテリウムの病原性に関与している *Ti* (tumor-inducing) プラスミドの一部である T-DNA が植物ゲノムに組み込まれる機能を有している。アグロバクテリウム法による植物の形質転換方法は、*Ti* プラスミドの T-DNA 領域を植物ゲノムに導入を所望する遺伝子に置き換えた形質転換用プラスミドを調製し、当該形質転換用プラスミドを *Ti* プラスミドの代わりに有するように調製したアグロバクテリウムを用いて、上記のアグロバクテリウムの機能を利用することにより、当該植物ゲノムに導入を所望する遺伝子を植物ゲノム中に導入する方法である。

## 【0003】

アグロバクテリウム属細菌は双子葉植物のみを宿主とし、単子葉植物には寄生しないとされていたため、当初、アグロバクテリウム法による植物の形質転換法は主として双子葉植物の形質転換法として発展した。単子葉植物へのアグロバクテリウム法による遺伝子導入についても様々な試みがなされ、強病原性アグロバクテリウムの病原性遺伝子の一部を有するスーパーバイナリーベクターが開発され、このベクターを用いた方法においては、イネ、トウモロコシなどの単子葉植物においても安定して、比較的効率よく形質転換されることが報告された（例えば、特許文献 1 および 2、ならびに、非特許文献 1 および 2 を参照）。さらに、コムギ、オオムギおよびソルガムといった単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換の成功例が報告され（例えば、非特許文献 3 ないし 5 を参照）、単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換も広く行われるに至った。

## 【0004】

アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNA という特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、現在では双子葉、単子葉を問わず多くの植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

## 【0005】

アグロバクテリウムによる形質転換方法は、植物種により供試材料、培養培地の組成は異なるが、いずれの植物においても材料となる組織にアグロバクテリウム懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出する点は共通している。一般に、材料となる植物組織は、必要に応じ滅菌処理がなされるが、それ以外に特別な処理をすることなくアグロバクテリウムの感染が行われる（例えば、非特許文献 6 ないし 9 を参照）。

## 【0006】

アグロバクテリウムによる形質転換は多くの植物種で報告されているが、その形質転換効率は植物の種、遺伝子型そして材料となる組織により大きく異なる（例えば、非特許文献 10 を参照）という問題点もある。実用遺伝子を導入した品種を育成する場合、多数の形質転換植物を作出する必要がある、一年を通じて高い効率で安定して形質転換植物の得られる技術の開発は重要である。また、植物の種や遺伝子型によらない形質転換法は、効率的に実用品種を育成する上で極めて有用である。さらに、材料となる植物の組織によら

ない形質転換法の開発も、形質転換を効率的に進める上で必要である。

【0007】

このように遺伝子導入効率を向上させる、あるいは遺伝子導入が困難な植物種や遺伝子型も形質転換できる方法の開発は重要である。現在までに、培地組成の検討、マーカー遺伝子もしくはプロモーターの改変、供試材料の検討、供試材料の処理方法の検討など、様々な側面から、効率よく形質転換植物を得るための多くの技術が報告されている。例えば、供試材料の処理方法では、組織を付傷することで感染効率を向上させたり、または、組織を付傷せずに植物組織を遠心処理（例えば、特許文献3および4を参照）、加熱処理（例えば、特許文献5および6を参照）したりする方法などが報告されている。また、本発明者らは、植物組織を加圧処理することが遺伝子導入効率の向上に有用であることを見いだしている（結果は未発表である）。

【0008】

また、特に単子葉植物の中でもトウモロコシについては、アグロバクテリウム法による形質転換における形質転換効率がイネと比較して低いことが問題であった。これまでにも、アグロバクテリウム法によるトウモロコシの形質転換において形質転換効率を向上させるための種々の試みがなされてきた（例えば、非特許文献11ないし14を参照）。アグロバクテリウム法でのトウモロコシの形質転換効率を向上させる種々の試みとしては、N6基本培地での形質転換細胞の選抜（例えば、非特許文献12を参照）、培地への硝酸銀（ $\text{AgNO}_3$ ）およびカルベニシリンの添加（例えば、非特許文献12および14を参照）、共存培地へのシステインの添加（例えば、非特許文献13を参照）等がなされてきたが、その効果はまだ低い。トウモロコシのような主要な穀物であって形質転換効率の低い植物については、特に、実用的な形質転換植物を作出する場合のみならず、新規な遺伝子の効果を確認する場合にも、更に形質転換効率の高い形質転換方法が望まれている。

【0009】

$\text{CuSO}_4$ は植物組織培養の多種の培地に微量無機塩として含まれている。通常、植物の組織培養培地に含まれる $\text{CuSO}_4$ の濃度は $0.1 \mu\text{M}$ である。近年、単子葉植物の組織培養および形質転換試験において培地に通常の50～500倍以上の $\text{CuSO}_4$ を添加することにより種々の効果のみられることが報告されている。Ghaemiら（非特許文献15を参照）はコムギの葯を $10 \text{ mg/l}$ の $\text{CuSO}_4$ および $2.5 \sim 5 \text{ mg/l}$ の $\text{AgNO}_3$ を含む培地で培養することにより胚状体（embryoid）の形成率が高まることを報告した。Zhangら（非特許文献16を参照）はオオムギの完熟種子から発芽したシュートを $5 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ および $30 \text{ g/l}$  マルトースを含む培地で培養することにより苗条分裂組織培養（shoot meristematic cultures: SMCs）の誘導率が高まることを報告した。マルトースは褐変組織の減少に効果があり、 $\text{CuSO}_4$ は苗条分裂組織培養が誘導されたときのシュートの発育の促進に効果があるとしている。また、未熟胚を $\text{CuSO}_4$ を含む培地で培養することにより得られたカルスでは再分化率やカルス当たりの再分化植物数が増大することがオオムギ（例えば、非特許文献17および18を参照）やイネ（例えば、非特許文献19を参照）で報告されている。さらに $\text{CuSO}_4$ を含む培地で誘導された緑色の再分化能を有する組織は形質転換の材料として適したものであるとされている（例えば、特許文献7および8を参照）。

【0010】

Ishidaら（非特許文献14を参照）はアグロバクテリウムを接種し、共存培養を行ったトウモロコシ（品種H99）の未熟胚を $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4$ を含む培地で培養し未熟胚からのカルス形成を調査した。 $1 \sim 10 \mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4$ を含む培地でカルス形成率の向上がみられたが、その効果はわずかであった。

【0011】

以上のように高濃度の $\text{CuSO}_4$ を培地に添加することにより単子葉植物の組織培養において種々の効果のみられることが報告されている。しかし、 $\text{CuSO}_4$ の添加が遺伝子導入効率および/または形質転換効率に及ぼす効果を調査した報告はこれまでにない。

【特許文献1】特許第2,649,287号公報

- 【特許文献2】特許第3,329,819号公報  
【特許文献3】国際公開第02/12520号パンフレット  
【特許文献4】特開2000-342256  
【特許文献5】特開2000-342255  
【特許文献6】特開2000-342253  
【特許文献7】米国特許第6,235,529号明細書  
【特許文献8】米国特許第6,541,257号明細書  
【特許文献9】国際公開第95/06722号パンフレット  
【非特許文献1】Hiei, Y., et al., (1994), The Plant Journal, Vol. 6, p. 271-282.  
【非特許文献2】Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol. 4, p. 745-750.  
【非特許文献3】Cheng, M., et al., (1997), Plant Physiology, Vol. 115, p. 971-980.  
【非特許文献4】Tingay, S., et al., (1997), Plant J., Vol. 11, p. 1369-1376  
【非特許文献5】Zhao, Z-Y., et al., (2000), Plant Mol. Biol., Vol. 44, p. 789-798.  
【非特許文献6】Rogers, S. G., et al., (1988), Method for Plant Molecular Biology, p. 423-436, CA:Academic Press Inc.  
【非特許文献7】Visser, R. G. F., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B5:1-9, Kluwer Academic Publishers.  
【非特許文献8】McCormick, S., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B6:1-9, Kluwer Academic Publishers.  
【非特許文献9】Lindsey, K., et al., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B7:1-13, Kluwer Academic Publishers.  
【非特許文献10】Potrykus, I., et al., (1998), Agricultural Biotechnology, NY:Merckel Dekker Inc., p. 119-159.  
【非特許文献11】Negrotto, D., et al., (2000), Plant Cell Reports, Vol. 19, p. 798-803.  
【非特許文献12】Zhao, Z-Y., et al., (2001), Mol. Breeding, Vol. 8, p. 323-333.  
【非特許文献13】Frame, B. R., et al., (2002), Plant Physiology, Vol. 129, p. 13-22.  
【非特許文献14】Ishida, Y., et al., (2003), Plant Biotechnology, Vol. 14, p. 57-66.  
【非特許文献15】Ghaemi, M., et al., (1994), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 36, p. 355-359.  
【非特許文献16】Zhang, S., et al., (1999), Plant Cell Reports, Vol. 18, p. 959-966.  
【非特許文献17】Dahleen, L. S., (1995), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 43, p. 267-269.  
【非特許文献18】Cho, M-J., et al., (1998), Plant

Science, Vol. 138, p. 229-244.

【非特許文献19】Sahrawat, A. K. and Chand, S., (1999), J. Plant Physiol., Vol. 154, p. 517-522.

【非特許文献20】Trick, H. N. and Finer, J. J., (1997), Transgenic Research, Vol. 6, p. 329-336.

【非特許文献21】Amoah, B., et al., (2001), Journal of Experimental Botany, Vol. 52, P. 1135-1142.

【非特許文献22】Hoekema, A., et al., (1983), Nature, Vol. 303, p. 179-180.

【非特許文献23】Komari, T. and Kubo T., (1999), Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasil, I. K. (ed.) Molecular improvement of cereal crops., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 43-82.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明が解決しようとする課題は、従来のアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入方法における植物の遺伝子導入効率よりも、高い効率で遺伝子導入のなされる方法を開発することにある。また、従来のアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入方法における植物の供試組織からの形質転換細胞の増殖率よりも高い効率で、形質転換細胞の増殖のなされる方法を開発することにある。さらに、本発明が解決しようとする課題は、前記方法を使用した、形質転換植物の製造方法を開発することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは上記問題解決のため鋭意研究に努めた結果、金属塩の濃度を高めた培地を用いてアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入を行うことにより、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いたときと比較して、安定して高い効率で遺伝子導入のなされること、および安定して高い効率で遺伝子導入した組織からの細胞の増殖がみられることを見いだした。さらに、金属塩の濃度を高めた培地を用いて遺伝子導入を行うことに加えて、アグロバクテリウム属細菌に植物材料を感染させる前に、加熱・遠心処理を行うと、安定してさらに高い効率で遺伝子導入のなされることを見いだした。また、遺伝子導入された植物材料について、さらに形質転換体の選抜を行い、金属塩の濃度を高めた培地を用いて遺伝子導入を行った植物材料は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いたときと比較して、飛躍的に形質転換効率が向上することを見いだした。

【0014】

したがって、本発明は、

1) 植物材料を処理し、

2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる、

ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であって、上記1) および/または2) の工程において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法に関する。

【0015】

本発明の方法において、培地に高い濃度で添加される金属塩は、銅イオンを含む金属塩である。本発明に用いる望ましい金属塩は、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) またはグルコン酸銅 ( $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Cu}$ ) であり、最も望ましくは硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) である。

## 【0016】

本発明の方法において、金属塩の濃度を高めた培地とは、当業者によく知られている N6 基本培地、MS (LS) 基本培地、B5 基本培地、NN 基本培地、NT 基本培地、Kao の基本培地、White の基本培地などの基本培地に含まれる金属塩の濃度と比較して高濃度の金属塩を含む培地をいう。高濃度とは、当該基本培地に含まれる金属塩の濃度よりも高いことを言う。

## 【0017】

具体的には、各基本培地の金属塩の濃度、例えば  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  濃度は、N6 基本培地では  $0\text{ mg/l}$ 、MS (LS) 基本培地では  $0.025\text{ mg/l}$ 、B5 基本培地では  $0.025\text{ mg/l}$ 、NN 基本培地では  $0.025\text{ mg/l}$ 、NT 基本培地では  $0.025\text{ mg/l}$ 、Kao の基本培地では  $0.025\text{ mg/l}$ 、White の基本培地では  $0\text{ mg/l}$  であり、これらの基本培地をもとに作成した培地において、当該基本培地に含まれる硫酸銅の濃度よりも高濃度の硫酸銅を含む場合には、その培地は金属塩の濃度を高めた培地である。

## 【0018】

本発明における、銅イオンを含む金属塩とは、例示した基本培地に一般に、含まれていないか、または微量に含まれる銅イオンを含む金属塩を意味する。

好ましい濃度の例を挙げると硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) およびグルコン酸銅 ( $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Cu}$ ) では  $1 \sim 100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは  $1 \sim 10\text{ }\mu\text{M}$  である。

## 【0019】

本発明の方法において、金属塩の濃度を高めた培地を用いる工程は、1) 植物材料を調製する工程、および/または 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程のいずれか 1 の工程である。望ましくは少なくとも 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程で金属塩の濃度を高めた培地を用いる。さらに望ましくは、少なくとも 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程に含まれる、共存培養の段階で金属塩の濃度を高めた培地を用いる。

## 【0020】

本発明の方法においては、さらに遺伝子導入効率を向上させるために、植物材料を調製する工程 1)、および/または、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) において、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からなる群から選択される少なくとも 1 の処理を植物材料に行うことを更に含んでもよい。植物材料の加圧処理は、当該植物を液体培地中で  $1.7 \sim 10\text{ atm}$  で  $0.1\text{ 秒間} \sim 4\text{ 時間}$ 、望ましくは  $2.4 \sim 8\text{ atm}$  で  $1\text{ 秒間} \sim 30\text{ 分間}$ 、加圧することで行う。植物材料の加熱処理は、当該植物材料を文献(特許文献 5 および 6)に記載の方法により処理することができ、たとえば、 $33 \sim 60^\circ\text{C}$  で  $5\text{ 秒間} \sim 24\text{ 時間}$ 、望ましくは  $46^\circ\text{C}$ 、 $3\text{ 分間}$  加熱することで行う。植物材料の遠心処理は、当該植物材料を Hiei らの方法(特許文献 3 および 4)により処理することができ、たとえば、 $100\text{ G} \sim 25\text{ 万 G}$  で  $1\text{ 秒間} \sim 4\text{ 時間}$ 、望ましくは  $2\text{ 万 G}$  で  $10\text{ 分間}$  遠心することで行う。超音波処理については、文献(例えば、非特許文献 20 および 21)に記載されている方法により処理することができる。

これらの加圧処理、加熱処理、遠心処理、および超音波処理の処理はいずれか 1 つを行ってもよく、また複数組み合わせで行ってもよい。

## 【0021】

本発明の方法は、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) に次いで、さらに、

3) 形質転換細胞を選抜し、

4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、  
工程を含んでもよい。

## 【0022】

また、本発明の方法は、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程 2) に次いで、さらに、少なくとも以下の 1 の工程において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地



を用いて、

3) 形質転換細胞を選抜し、

4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、  
工程を含んでもよい。

#### 【0023】

本発明の遺伝子導入方法を使用することで、遺伝子導入効率が向上することから、結果として形質転換された植物を効率よく得ることができる。したがって、本発明は、本発明の遺伝子導入方法を使用することを特徴とする、形質転換植物の製造方法にも関する。

#### アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入および形質転換方法

アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入は、一般には以下の工程を含む：

a) 植物材料を調製する工程；

b) 所望の導入遺伝子を含むベクターを含むアグロバクテリウム属細菌を調製する工程；  
c) 工程 a) で調製した植物材料を b) で調製したアグロバクテリウム属細菌で感染する工程。

#### 【0024】

さらに、形質転換体を得るために、上記工程 c) に次いで

d) 形質転換細胞を選抜する工程；および

e) 所望により選抜された形質転換体を再分化する工程  
を施してもよい。

#### 【0025】

具体的には、単子葉植物においては、文献（特許文献1）に記載されているように、上記 a) の工程でオーキシシン（例えば、2, 4-D（2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸））またはサイトカイニン等を含む培地で培養して植物材料を脱分化の状態または脱分化過程にある状態にし、上記 c) の工程でアグロバクテリウムに感染させることを特徴とする方法；または、文献（特許文献2）に記載されているように、植物材料として当該植物の未熟胚を用い、上記 a) の工程では未熟胚を脱分化処理せず、上記 c) の工程においてオーキシシン（例えば、2, 4-D）またはサイトカイニン等を含む培地で培養することを特徴とする方法を用いることができる。

#### 【0026】

##### 工程 a) について

本明細書において、遺伝子導入に供される「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。単子葉植物には、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガス、ソルガムその他が含まれるがこれらに限定されるものではない。双子葉植物にはタバコ、ダイズ、ジャガイモ、ワタ、ヒマワリ、その他が含まれるが、これらに限定されるものではない。望ましくは、植物は単子葉植物であり、最も望ましくはトウモロコシである。

#### 【0027】

また、「植物材料」とは、非限定的に、アグロバクテリウム法による植物の形質転換に供するための当該植物の細胞、葉、根、茎、実、その他いずれの部位の植物組織、未熟胚、カルスもしくは不定胚様組織（以下、本明細書においてカルス等、または単にカルスという）、または完全な植物体など植物のあらゆる態様を包含する。

#### 【0028】

本発明の方法に用いる植物の形態として望ましいのは未熟胚またはカルスであり、最も望ましいのは未熟胚である。本明細書において、植物の細胞、組織、完全な植物体という表現は、技術分野において一般的に用いられる意味で用いられる。本明細書において、未熟胚とは、受粉後の登熟過程にある未熟種子の胚をいう。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ（熟期）は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよい。もっとも、受粉後2日以降のものが好ましい。後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインブレッド、インブレッド間の

F1、インブレッドと自然受粉品種間のF1、市販F1品種の未熟胚であることが好ましい。本明細書において、カルスとは、無秩序に増殖する未分化状態の細胞塊をいう。カルスを得るためには、植物組織の分化した細胞をオーキシン（例えば、2, 4-D）またはサイトカイニン等の植物成長調節物質を含む培地（脱分化培地という）において培養して得ることができる。このカルスを得るための処理を脱分化処理といい、またこの過程を脱分化過程という。

#### 【0029】

工程a)において、必要に応じ、植物組織、未熟胚などを植物体、種子などから取り出し、形質転換に好適な材料を調製する。また、所望により植物材料をアグロバクテリウムに感染させる前に培養してもよい。

#### 【0030】

本発明では、工程a)で植物材料を調製する過程、および/または、工程c)でアグロバクテリウムに感染させる過程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする。加えて、工程a)で植物材料を調製する過程において加圧処理を行ってもよい。

#### 【0031】

##### 工程b)について

土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン（サイトカイニンとオーキシン）の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している（例えば、特許文献4の図3及び図4）。

#### 【0032】

アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

#### 【0033】

まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 (disarmed strains) であるLBA4404（非特許文献22参照）、C58C1 (pGV3850)、GV3Ti11SEなどが作製された。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型TiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる。

#### 【0034】

もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virEおよびvirGが存在し、（植物バイオテク

ノロジー事典（エンタプライズ株式会社発行（1989））、*vir*領域とはこの*virA*、*virB*、*virC*、*virD*、*virE*および*virG*の全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。

#### 【0035】

アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの、公知の方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19、pBI121、pGA482などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Riプラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

#### 【0036】

アグロバクテリウムA281は、強病原性（*super-virulent*）の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである。pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101およびEHA105を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。

#### 【0037】

もう一つは、スーパーバイナリーベクター（‘*super-binary*’ *vector*）（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献23；および特許文献9を参照）システムである（例：特許文献4の図4）。このシステムは、*vir*領域（*virA*、*virB*、*virC*、*virD*、*virE*および*virG*（以下、これらをそれぞれ「*vir*断片領域」ということもある。））を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターに*vir*断片領域のうち、少なくとも一つの*vir*断片領域を実質的に取除いた*vir*領域の断片（このうち好ましくは少なくとも*virB*または*virG*を含む断片、さらに好ましくは*virB*および*virG*を含む断片）を組み込んだスーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる。

#### 【0038】

本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens*（例えば上述の*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404（非特許文献22を参照））およびEHA101を好ましく用いることができる。

#### 【0039】

本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性（*vir*）領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した、異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である（例えば、アグロバクテリウム属細菌の*vir*領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、*vir*領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど）。また、本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

## 【0040】

植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導入することができる。限定されるわけではないが、導入される遺伝子の大きさは好ましくは約100bpないし200kbpである。

## 【0041】

また、プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

## 【0042】

植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

## 【0043】

工程c) について

アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物材料をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物材料を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

## 【0044】

好ましくは、植物材料をアグロバクテリウムに感染させると同時に、あるいは感染後、アグロバクテリウムを除去する前に、植物材料をアグロバクテリウムと共存培養させる。共存培養には公知の培地を使用できる。例えば、実施例で使用したLS-AS培地、nN6-As培地、あるいはその他、N6S3-AS培地、2N6-AS培地（非特許文献1を参照）等の培地が知られている。

## 【0045】

本発明において、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程c)の前または最中に、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からなる群から選択される、少なくとも1つの処理を植物材料に行ってもよい。これらの処理も、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入する方法において、遺伝子導入の効率を高めることが知られている。例えば、遠心処理については、文献（例えば、特許文献3および4）に記載されており、好ましくは、100Gないし25万Gで1秒間ないし4時間、遠心することで行う。熱処理については、文献（例えば、特許文献5）に記載されており、好ましくは、33℃ないし60℃の温度範囲で、5秒間ないし24時間の熱処理を行う。さらに、超音波処理については、文献（例えば、非特許文献20および21）に記載されている。

## 【0046】

これらの加圧、加熱、遠心、および超音波等の処理はいずれか1つを行ってもよく、また複数組み合わせを行ってもよい。例えば、特許文献6は、熱処理と遠心処理を組み合わせで行うことについて記載している。

## 【0047】

工程 d) および e) について

さらに所望により、形質転換体を得るためには、上記工程 c) に次いで

d) 形質転換細胞を選抜する工程；および

e) 所望により選抜された形質転換体を再分化する工程

が必要である。即ち、一般に植物の形質転換を行うためには、植物細胞に外来遺伝子を導入した後に、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれた植物細胞を選抜することが必要である。

**【0048】**

本発明では、工程 d) で形質転換細胞を選抜する工程、および／または、工程 e) で所望により選抜された形質転換体を再分化する工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いてもよい。

**【0049】**

形質転換された細胞を選抜する工程は、表現型のデータおよび物理的データの少なくとも一つ、好ましくは両方が目的の形質を有する細胞を選択する、ことを意味する。

表現型のデータは、例えば、形質転換効率は植物への導入を所望する遺伝子と共に、マーカー遺伝子および／または選択マーカー遺伝子を導入してその発現を評価することで行うことで得ることができる。マーカー遺伝子および／または選択マーカー遺伝子としては、例えば、GUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 遺伝子、および／または、抗生物質耐性遺伝子 (例えば、PPT (フォスフィノスライシン) 耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子) など、を用いることができる。マーカー遺伝子として GUS 遺伝子を用いた場合、形質転換効率の評価は X-guc (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸) の GUS による切断に伴う発色から評価することができる。選択マーカー遺伝子として抗生物質耐性遺伝子を用いた場合には、形質転換した後、抗生物質を加えた選抜培地上での成長の度合いから評価することができる。

**【0050】**

さらに、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれたことを確認するためには、サザンブロット等の物理的データを得ることが好ましい。より好ましくは、有性生殖による子孫への伝達、並びに子孫集団への遺伝的および分子的分析に基づく選抜、の工程を行ってもよい。

**【0051】**

所望により選抜された形質転換体の再分化を行い、再分化個体を生育させ、そして完全な植物体を得てもよい。選抜した形質転換細胞から完全な植物体を再生するには、公知の方法 (例えば、非特許文献 1 および 2) により行うことができる。

**【0052】**

本発明の方法は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いた場合と比較して、遺伝子導入効率および／または形質転換効率を向上させる。遺伝子導入効率は、例えば、導入した遺伝子の一過性の発現の範囲を評価することにより行うことによって評価できる。後述の実施例では、未熟胚の胚盤での GUS 遺伝子の一過性の発現を 1 (スポット状の発現が散見) ~ 5 (胚盤の全面で発現) の 5 段階の指数で評価した。あるいは、全体の発現量が低い場合には、全てのスポット数を数えることにより評価することもできる。

**【0053】**

形質転換効率は、例えば、接種した未熟胚から得られた再分化植物のうち GUS 遺伝子の発現を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除すことにより算出できる。あるいは、再分化植物のうち、選抜圧に対して抵抗性を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除すことにより算出することもできる。

**【発明の効果】****【0054】**

本発明は、従来のアグロバクテリウム法よりもより高い効率で遺伝子導入のなされる安価で簡便な方法を開発する。また、従来のアグロバクテリウム法では遺伝子導入が困難と

されていた植物種および品種にも適応できる方法を提供する。本発明の方法は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いた場合と比較して、遺伝子導入効率および／または形質転換効率を向上させる。

#### 【0055】

図1に示したように、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) を高濃度含む共存培地を用いることにより、単子葉植物であるトウモロコシについての遺伝子導入効率が、硫酸銅を含まない培地を用いたときと比較して2倍ないし2.5倍に向上した。また、さらに加熱・遠心処理を加えることで、遺伝子導入効率は硫酸銅を含まない培地および未処理の植物材料を用いたときと比較して1.5倍ないし3倍に向上した。

#### 【0056】

本発明により、植物のアグロバクテリウム法による遺伝子導入効率が向上したことから、多数の形質転換植物を効率よく得ることができ、実用遺伝子を導入した品種の育成を効率よく、容易にするのに貢献する。特に、単子葉植物、なかでもトウモロコシは従来のアグロバクテリウム法では形質転換効率が低かったため、本発明の方法により形質転換効率が向上したことの意義は大きい。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 【実施例】

#### 【0057】

#### 実施例1 共存培地への $\text{CuSO}_4$ の添加がトウモロコシ遺伝子導入に及ぼす効果

##### 材料および方法

受粉後7から14日目のトウモロコシ (品種: A188、H99) の未熟胚 (大きさ1.0-1.5 mm) を無菌的に採取し、LS-inf液体培地 (LS無機塩、0.5 mg/l ニコチン酸、0.5 mg/l ピリドキシン塩酸塩、1 mg/l チアミン塩酸塩、100 mg/l ミオーイノシトール、1 g/l カザミノ酸、1.5 mg/l 2, 4-D、68.5 g/l シュークロース、36 g/l グルコース、pH 5.2; 非特許文献2を参照) で1回洗浄した。遺伝子導入効率を高めるための前処理 (46℃、3分間の熱処理および15,000 rpm、10分間の遠心処理) を一部の未熟胚で行った。100  $\mu\text{M}$  アセトシリンゴンを含むLS-inf液体培地に約  $1.0 \times 10^9$  cfu/mlで *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB131) (T-DNA領域にカリフラワーモザイクウイルス 35SプロモーターでドライブされたPPT (フォスフィノスライシン) 耐性遺伝子、およびカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーターにヒマ カタラーゼイントロンを結合したGUS遺伝子を有する; 非特許文献2を参照) を懸濁し接種源とした。採取・洗浄した未熟胚および熱・遠心処理した未熟胚に接種源を加え、30秒間攪拌した後、5分間室温で静置した。5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  を含むLS-AS培地 (LS無機塩、0.5 mg/l ニコチン酸、0.5 mg/l ピリドキシン塩酸塩、1 mg/l チアミン塩酸塩、100 mg/l ミオーイノシトール、700 mg/l L-プロリン、1.5 mg/l 2, 4-D、20 g/l シュークロース、10 g/l グルコース、500 mg/l MES、100  $\mu\text{M}$  アセトシリンゴン、8 g/l 寒天、pH 5.8; 非特許文献2を参照、固化剤は8 g/l アガロース) に0-10  $\mu\text{M}$  の濃度で  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  を添加した共存培地にアグロバクテリウムを接種した未熟胚を胚盤が上になるように置床した。

#### 【0058】

25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部の未熟胚を0.1%のTriton X-100を含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸 (X-gluc) および20%メタノール含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、顕微鏡下で観察し、青色を呈する



組織の範囲を調査した。

#### 【0059】

共存培地上で3日間培養した未熟胚をLSD1.5培地(LS無機塩、0.5mg/lニコチン酸、0.5mg/lピリドキシン塩酸塩、1mg/lチアミン塩酸塩、100mg/lミオーイノシトール、700mg/lL-プロリン、1.5mg/l2,4-D、20g/lシュクロース、500mg/lMES、8g/l寒天、pH5.8;非特許文献2を参照)に置床し、25℃、暗黒下で約4週間培養した後、増殖したカルスの直径を測定した。あるいは、共存培地上で7日間培養した未熟胚を10mg/lのフォスフィノスライシン(PPT)を含むLSD1.5培地に置床し、25℃、暗黒下で1週間培養した後、顕微鏡下で観察し、カルス形成の度合いを調査した。

#### 【0060】

##### 結果

各種共存培地で3日間培養した未熟胚(品種A188)をX-gluにより染色し、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位(青色を呈する部位)の範囲を0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の5段階で評価した。

#### 【0061】

1、5および10μMのCuSO<sub>4</sub>を含む共存培地で3日間培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ胚盤の広い範囲でGUS遺伝子の一過的な発現を示した。共存培地にCuSO<sub>4</sub>を添加することによるGUS遺伝子の一過的発現を示す範囲の増大は熱・遠心の前処理の有無に関わらず認められた(図1)。これらのことから、共存培地にCuSO<sub>4</sub>を添加することにより遺伝子導入効率が高まることが明らかとなった。

#### 【0062】

各種の共存培地で3日間培養を行った未熟胚(品種H99)を選抜圧を含まない培地で約4週間培養した後、形成されたカルスの直径を調査した。5μM AgNO<sub>3</sub>を含む共存培地で培養した未熟胚は対照の培地で培養したものと同様のカルス増殖を示した。これに対し、10μM CuSO<sub>4</sub>および5μM AgNO<sub>3</sub>を添加した共存培地で培養した未熟胚は直径の平均が対照の共存培地で培養した未熟胚に比べ2mm以上も大きく、CuSO<sub>4</sub>の添加によりカルスの増殖が促進することが示された(図2)。

#### 【0063】

1週間の共存培養後、10mg/l PPTを含む選抜培地で1週間培養した未熟胚(品種A188)からのカルス形成を3(胚盤全体がカルス化)から0(カルス形成なし)の4段階で評価した。CuSO<sub>4</sub>を添加した培地で培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ高いカルス形成を示し、CuSO<sub>4</sub>の添加により形質転換カルス形成の効率が向上する可能性が示された(図3)。

#### 【0064】

以上のように共存培地へのCuSO<sub>4</sub>の添加はアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を高め、カルス形成および増殖を促進することが明らかとなり、CuSO<sub>4</sub>の添加は形質転換効率を向上させる効果のあることが示された。

### 実施例2 共存培地へのCuSO<sub>4</sub>の添加がイネ遺伝子導入に及ぼす効果

#### 材料および方法

50mg/lハイグロマイシンおよび50mg/lスペクチノマイシンを含むAB培地(3g/lKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/lNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/lNH<sub>4</sub>Cl、300mg/lMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、150mg/lKCl、10mg/lCaCl<sub>2</sub>、2.5mg/lFeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5g/lグルコース、15g/l寒天、pH7.0;Chilton, M. -D., et al., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 71:3672-3676)上で3~4日間培養したAgrobacterium tumefaciensスーパーバイナリーベクターLB4404(pSB134)(T-DNA領域にトウモロコシユビキチンプロモーターでドライブされたユビキチンイントロンを結合したHP T遺伝子(ハイグロマイシン耐性

遺伝子) およびカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターでドライブされたヒマカターゼイントロンを結合した GUS 遺伝子を有する; pSB134 の作成は pKY205 (WO 03/027290 を参照) に発現マーカーとして pSB32 由来の 35S-introtron GUS-nos 断片を HindIII 部位に挿入することにより行った) を白金耳でかきとり、約  $10^9$  cfu/ml の濃度で  $100 \mu\text{M}$  アセトシリンゴンを含む液体培地 (AA 主要無機塩、LS 微量無機塩、MS ビタミン、AA アミノ酸、 $0.2 \text{ g/l}$  カザミノ酸、 $4 \text{ g/l}$  シュークロース、 $2 \text{ g/l}$  グルコース、 $\text{pH } 5.2$ )  $1 \text{ ml}$  に懸濁した。無菌的に採取した未熟胚 (品種 IR64) を入れたエッペンドルフチューブにアグロバクテリウム懸濁液  $1 \text{ ml}$  を加え、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で 5 分間静置した。未熟胚を nN6-As 培地 (N6 無機塩、N6 ビタミン、 $0.5 \text{ g/l}$  カザミノ酸、 $0.5 \text{ g/l}$  L-プロリン、 $1 \text{ mg/l}$  2, 4-D、 $0.5 \text{ mg/l}$  NAA、 $0.1 \text{ mg/l}$  6BA、 $20 \text{ g/l}$  シュークロース、 $10 \text{ g/l}$  グルコース、 $10 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ 、 $100 \mu\text{M}$  アセトシリンゴン、 $8 \text{ g/l}$  アガロース、 $\text{pH } 5.2$ ) および  $5 \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  を含む nN6-As 培地に置床し、暗黒下、 $25^\circ\text{C}$  で 1 週間培養した。

#### 【0065】

##### 結果

共存培養後の未熟胚を X-gluc により染色し、GUS 遺伝子の一過的発現を示す部位 (青色を呈する部位) の範囲を 0 (無発現) から 4 (胚盤のほぼ全面で発現) の 5 段階で評価した。

#### 【0066】

$5 \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  を含む共存培地で 1 週間培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ胚盤の広い範囲で GUS 遺伝子の一過的な発現を示した (図 4)。このことから、共存培地への  $\text{CuSO}_4$  の添加による遺伝子導入効率の向上はトウモロコシだけでなく、イネにおいてもみられることが明らかとなった。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0067】

【図 1】図 1 は、共存培地への  $\text{CuSO}_4$  の添加による、トウモロコシ (A188) の GUS 遺伝子の一過的発現に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、GUS 遺伝子の一過的発現を示す部位の範囲を数値化した値であり、0 (無発現) から 4 (胚盤のほぼ全面で発現) の範囲で数値化した。グラフの横軸に示す “Cu x” (ここで、x は数字を表す) は、共存培地中の  $\text{CuSO}_4$  濃度が  $x \mu\text{M}$  であることを示す。

【図 2】図 2 は、共存培養後のトウモロコシ (H99) のカルス形成に及ぼす、共存培地中の  $\text{CuSO}_4$  濃度の効果を示すグラフである。グラフの横軸における、“Ag x” および “Cu x” (ここで、x は数字を表す) はそれぞれ、共存培地中の  $\text{AgNO}_3$  および  $\text{CuSO}_4$  の濃度が  $x \mu\text{M}$  であることを示す。

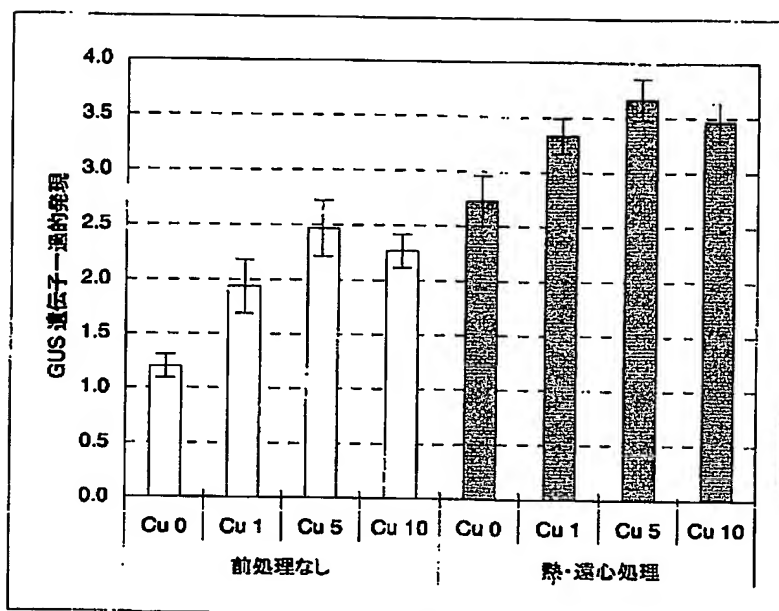
【図 3】図 3 は、共存培養後のトウモロコシ (A188) のフォスフィノスライシン (PPT) 抵抗性カルス形成に及ぼす、共存培地中の  $\text{CuSO}_4$  濃度の効果を示すグラフである。縦軸は、カルス形成を数値化した値であり、0 (カルス形成なし) から 3 (胚盤全体がカルス化) の段階で数値化した。グラフの横軸に示す “Cu x” (ここで、x は数字を表す) は、共存培地中の  $\text{CuSO}_4$  濃度が  $x \mu\text{M}$  であることを示す。

【図 4】図 4 は、共存培地への  $\text{CuSO}_4$  の添加による、イネ (IR64) の GUS 遺伝子の一過的発現に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、GUS 遺伝子の一過的発現を示す部位の範囲を数値化した値であり、0 (無発現) から 4 (胚盤のほぼ全面で発現) の範囲で数値化した。グラフの横軸に示す “Cu 5” は、共存培地中の  $\text{CuSO}_4$  濃度が  $5 \mu\text{M}$  であることを示す。

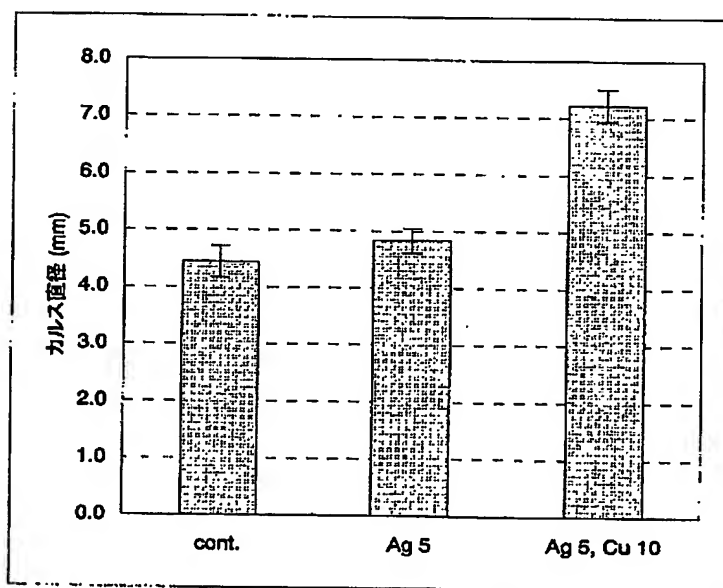


【書類名】 図面

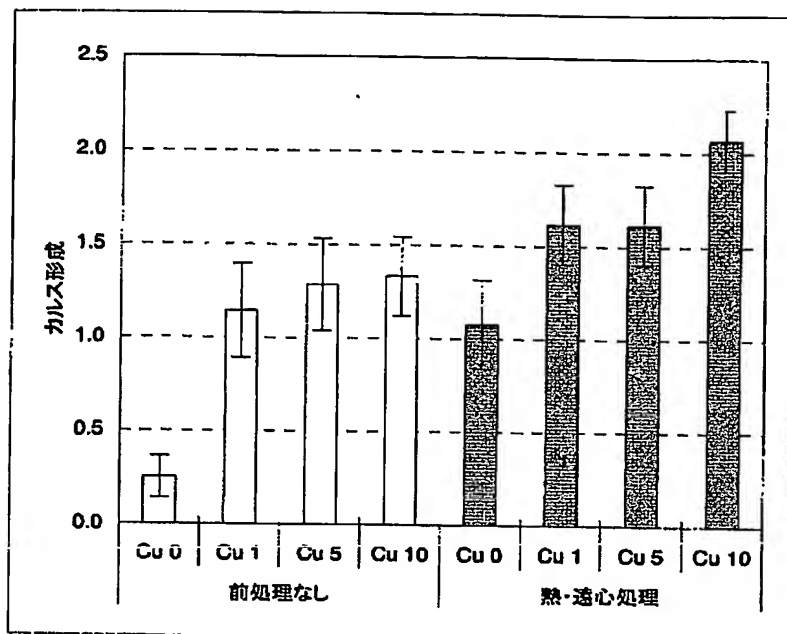
【図1】



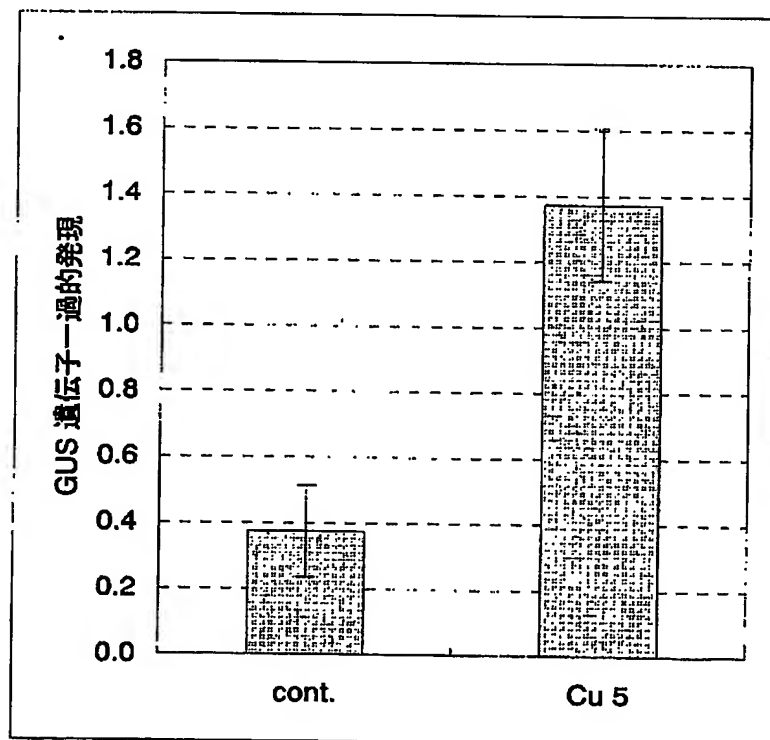
【図2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

本発明は、

1) 植物材料を処理し、次いで

2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる、

ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であって、上記 1) および／または 2) の工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法を提供する。また、本発明は、本発明の遺伝子導入方法を用いることを特徴とする形質転換植物の製造方法を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 2 9 3 0 6 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 4 5 6 9 ]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 5 月 1 6 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号
氏 名	日本たばこ産業株式会社